

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 août 2005 (18.08.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/076311 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
H01J 49/04, B01L 3/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/050053

(22) Date de dépôt international :
28 janvier 2005 (28.01.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0450173 30 janvier 2004 (30.01.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE** [FR/FR];
31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **SARRUT,
Nicolas** [FR/FR]; 140, rue Georges Maeder, F-38170
Seyssinet-Pariset (FR). **CONSTANTIN, Olivier** [FR/FR];
9, rue Léo Lagrange, F-38100 Grenoble (FR).

(74) Mandataire : **LEHU, Jean**; Brevatome, 3, rue du Docteur
Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

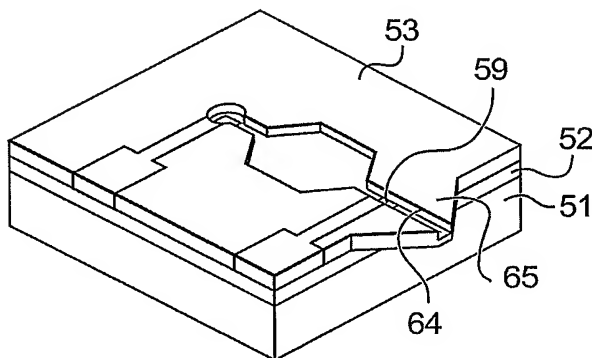
Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: LAB-ON-A-CHIP COMPRISING A COPLANAR MICROFLUIDIC SYSTEM AND ELECTROSPRAY NOZZLE

(54) Titre : LABORATOIRE SUR PUCE COMPRENANT UN RESEAU MICRO-FLUIDIQUE ET UN NEZ D'ELECTRONE-
BULISATION COPLANAIRES.



(57) Abstract: The invention relates to a lab-on-a-chip compris-
ing a fluidic system which is provided in a substrate, a fluid inlet
which is connected to the fluidic system and a fluid outlet which
is connected to the fluidic system. The aforementioned substrate
comprises a plane layer (53) containing the fluidic system and an
electrospray nozzle (65), said electrospray nozzle overhanging the
rest of the substrate (51, 52). Moreover, the electrospray nozzle
comprises a channel (64) having one end which is connected to the
fluidic system and another end which forms the above-mentioned
fluid outlet, said channel being equipped with electric conduction
means (59) forming at least one electrode.

(57) Abrégé : L'invention concerne un laboratoire sur puce com-
prenant un réseau fluidique réalisé dans un substrat, un orifice d'en-
trée de fluide relié au réseau fluidique et un orifice de sortie de
fluide relié au réseau fluidique. Le substrat comprend une couche
plane (53) dans laquelle sont réalisés le réseau fluidique et un nez d'électronébulisation (65), le nez d'électronébulisation étant en
surplomb par rapport au reste du substrat (51, 52) et comprenant un canal (64) dont une extrémité est reliée au réseau fluidique et
dont l'autre extrémité constitue ledit orifice de sortie de fluide, le canal étant équipé de moyens de conduction électrique (59) formant
au moins une électrode.

WO 2005/076311 A1

**LABORATOIRE SUR PUCE COMPRENANT UN RESEAU MICRO-
FLUIDIQUE ET UN NEZ D'ELECTRONEBULISATION COPLANAIRES**

DESCRIPTION

5 DOMAINE TECHNIQUE

L'invention se rapporte à un laboratoire sur puce comprenant un réseau micro-fluidique et un nez d'électronébulisation coplanaires. Elle concerne en particulier le couplage d'un laboratoire sur puce avec
10 un spectromètre de masse.

Depuis bientôt dix ans, de nombreuses voies ont été explorées pour coupler différents dispositifs micro-fluidiques aux spectromètres de masse. En effet, les méthodes de détection optiques comme la
15 spectrophotométrie ou la fluorescence ne sont pas adaptées à la détection de biomolécules comme les protéines ou les peptides, détection qui intéresse particulièrement le domaine de la protéomique. Les limites sont soit la sensibilité, soit la nécessité de
20 préparer l'échantillon (marquage fluorescent), ce qui, dans le cas de l'identification de protéines après digestion enzymatique par exemple, présente un problème puisque les peptides obtenus ne sont a priori pas connus. La spectrométrie de masse est donc souvent
25 retenue puisqu'elle donne des informations sur la nature des échantillons analysés (spectre d'intensité selon le rapport masse/charge) avec une très bonne sensibilité (femtomole/ μ l), et qu'elle permet d'analyser des mélanges complexes de molécules. Pour
30 cela, il est souvent nécessaire qu'un pré-traitement de l'échantillon soit réalisé en amont de l'analyse. Par

exemple, ce pré-traitement consiste en une séparation des composés chimiques et/ou biologique, précédée et/ou suivie d'une concentration des espèces.

Pour réaliser ce pré-traitement en continu
5 avec l'analyse en un temps minimum et en minimisant les volumes de réactifs utilisés, les progrès récemment réalisés dans le domaine de la micro-fluidique peuvent être mis à profit. A titre d'exemples, des dispositifs micro-fluidiques de digestion enzymatique (Lian Ji Jin,
10 "A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping", Lab Chip, 2003, 3, 11-18) , d'électrophorèse capillaire (B. Zhang et al., " Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry", Anal.
15 Chem., vol. 71, n°15, 1999, 3259-3264) ou de séparation 2D (J.D. Ramsey, "High-efficiency Two dimensional Separations of Protein Digests on Microfluidic Devices", Anal. Chem., 2003, 75, 3758-3764 ou N. Gottschlich et al., "Two-Dimensional
20 Electrochromatography / Capillary Electrophoresis on a Microchip", Anal. Chem.2001, 73, 2669-2674) ont déjà été présentés.

Le couplage microfluidique / spectrométrie de masse peut reposer sur une technique d'ionisation de
25 l'échantillon par électronébulisation ou électrospray (ou ESI pour ElectroSpray Ionization). A pression atmosphérique et plongé dans d'un champ électrique intense, l'échantillon liquide pré-traité sortant de la puce micro-fluidique est nébulisé en un gaz d'ions ou
30 en une multitudes de gouttelettes chargées pouvant entrer dans le spectromètre de masse (MS) pour analyse.

Cette nébulisation passe par la déformation de l'interface formée entre le liquide sortant et le gaz environnant (ménisque liquide/gaz) et la « goutte » de liquide prend une forme conique appelée « cône de Taylor ». Le volume de ce cône constitue un volume mort pour le liquide sortant (espace géométrique dans lequel les composés chimiques peuvent se mélanger), ce qui n'est pas souhaitable, surtout quand la dernière étape du pré-traitement consiste justement en une séparation des composés chimiques de l'échantillon. C'est pourquoi on cherche toujours à minimiser la taille de ce cône, et cela passe entre autres par la réduction des dimensions intérieures et extérieures du canal de sortie de la puce micro-fluidique.

Classiquement, au cours d'une analyse par spectrométrie de masse, l'échantillon est pré-traité « hors dispositif ESI » puis placé manuellement (à la pipette) dans une aiguille creuse dont l'extrémité est électriquement conductrice (« PicoTip emitter » de New Objective par exemple). Un champ électrique est imposé entre la partie conductrice du PicoTip et l'entrée du MS, ce qui permet la formation d'un cône de Taylor à la sortie du PicoTip et la nébulisation de l'échantillon. La géométrie cylindrique « pointue » des PicoTip est idéale pour la formation d'un petit cône de Taylor, mais les limites sur la minimisation de leur taille (classiquement de diamètre extérieur 360 μm et de diamètre intérieur 10 μm), celles sur l'obtention d'une bonne reproductibilité par les techniques de fabrication utilisées (étirement) et leur fragilité à l'utilisation sont les principales raisons pour

chercher à réaliser d'autres types de dispositifs de nébulisation.

Dans la littérature, lorsque ces dispositifs sont élaborés par des micro-technologies
5 comme les technologies planes du silicium par exemple (gravure, usinages, dépôts en couches minces et photolithographie de matériaux divers sur des substrats présentant des dimensions latérales très grandes devant leur épaisseur), on parle souvent de « nez
10 électrospray » (Tai et al., "MEMS electrospray nozzle for mass spectroscopy", WO-A-98/35376). L'enjeu de telles réalisations est double.

D'une part, les micro-technologies peuvent permettre de réaliser des interfaces ESI en définissant
15 des structures de type pointe (comme les PicoTips) mais plus petites (pour limiter le volume du cône de Taylor), plus reproductibles et moins fragiles, ce qui présente un intérêt en soi (voir le document WO-A-00/30167).

20 D'autre part, les micro-technologies peuvent permettre de réaliser des dispositifs intégrant un réseau fluide permettant d'assurer le pré-traitement de l'échantillon et une interface de type ESI. Outre les avantages précédemment cités (diminution
25 des volumes morts de sortie, reproductibilité, robustesse de l'interface ESI), on bénéficie de ceux liés à un dispositif de pré-traitement intégré (protocole de pré-traitement en continu avec l'analyse, diminution des temps globaux d'analyse, minimisation
30 des volumes de réactifs).

Néanmoins, une telle intégration pose trois problèmes majeurs de conception technologique :

- Premièrement, la technologie de réalisation du dispositif doit être compatible avec
5 celle d'un réseau fluide de pré-traitement (réservoirs, micro-canaux, réacteurs...) et d'une interface ESI (géométrie en pointes, dimensions de sortie minimales...), et ce, pour permettre de réaliser le dispositif complet sur un même support ou un même
10 ensemble de supports voyant un enchaînement technologique commun aux deux entités intégrées.

- En second lieu, elle doit être pensée pour ne pas rajouter de volume mort supplémentaire à ceux qui pourraient exister dans le réseau fluide de
15 pré-traitement et dans l'interface ESI pris séparément.

- Enfin, elle doit fournir à l'interface ESI une électrode de nébulisation sans ajouter de volume mort au système. Cette électrode de nébulisation peut être localisée soit à l'extérieur de la structure
20 en pointe (M.Svederberg et al., "Sheathless Electrospray from Polymer Microchips", Anal. Chem., 2003, 75, 3934-3940), soit à l'intérieur du canal de sortie et à proximité de la sortie du dispositif. Dans le premier cas, un champ électrique est imposé
25 uniquement à l'extérieur du dispositif, dans la portion d'air (ou d'un autre gaz) située entre l'extrémité de la pointe et l'entrée du MS. Dans le second cas, un champ électrique existe aussi à l'intérieur du dispositif, dans le segment de liquide situé entre
30 l'électrode et l'extrémité de la pointe. Pour l'implantation d'une électrode externe, il est souvent

rapporté (R.B. Cole, "Electrospray ionization mass spectrometry : fundamentals, instrumentation and applications", John Wiley & Sons : New York, 1997) qu'une difficulté majeure est de lui assurer une robustesse suffisante. En effet, les dépôts conducteurs réalisés à cet effet se dégradent très souvent trop rapidement sous l'action des champs électriques intenses.

10 **ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE**

Dès 1997, R.S. Ramsey et J.M. Ramsey, ("Generating Electrospray from Microchip Devices Using Electroosmotic Pumping", Anal. Chem., 1997, 69, 1174-1178) ont proposé une puce microfluidique en verre dont les flux de liquide sont générés par pompage électro-osmotique et dont le canal de sortie débouche dans la tranche du composant à géométrie plane. Sous l'assistance d'une surpression imposée en amont, il se forme en sortie de puce une goutte d'échantillon de 12 nl, qui, sous l'action d'un champ électrique intense, forme un cône de Taylor en se nébulisant. Cette approche simple pose le problème d'un volume mort de liquide important (12 nl), d'où une limite de sensibilité du dispositif.

Plus récemment, K. Huikko et al. ("Poly(dimethylsiloxane) electrospray devices fabricated with diamond-like-carbon-poly(dimethylsiloxane) coated SU-8 masters", Lab Chip, 2003, 3, 67-72) ont proposé une puce en poly(diméthylsiloxane) (PDMS) présentant elle aussi des

canaux débouchants destinés à être mis en regard d'un MS pour nébulisation de l'échantillon. Les auteurs tirent profit de l'hydrophobie du PDMS pour l'obtention d'un petit cône de Taylor d'où la limitation du volume mort de sortie. Néanmoins, le dispositif proposé n'intègre pas d'électrode de nébulisation. Les tests sont réalisés en utilisant un fil de platine plongeant dans le réservoir d'entrée du canal de l'ESI, ce qui ne peut pas constituer une bonne solution, c'est-à-dire sans ajout de volume mort, pour une éventuelle intégration à un réseau fluide de pré-traitement. Par ailleurs, la technologie PDMS reste une technologie limitée qui ne permet pas encore la conception de réseaux micro-fluidiques complexes et de taille caractéristique de l'ordre du micromètre. Ceci impose une forte limitation quant au dessin des entités micro-fluidiques nécessaires aux pré-traitements d'échantillons (concentration, séparation...).

M.Svederberg et al. ("Sheathless Electrospray from Polymer Microchips", Anal. Chem., 2003, 75, 3934-3940) proposent des dispositifs en polymère qui présentent des géométries très intéressantes pour la réalisation de nez électrospray (pointes 2D ou 3D) mais les dimensions du canal de sortie (100 µm de largeur × 70 µm de hauteur) obtenues par leur technologie d'usinage sont rédhibitoires pour la réalisation d'un dispositif à faibles volumes morts. En effet, on rappelle que le diamètre de sortie d'un PicoTip est de seulement 10 µm. En outre, l'utilisation de matériaux polymères impose de fortes limites quant à d'éventuelles fonctionnalisations chimiques ou

biologiques des parois internes du canal de sortie ou d'un éventuel réseau fluide de pré-traitement d'échantillon. En effet, jusqu'à maintenant, la plupart de ces fonctionnalisations ont été développées sur
5 silicium ou sur verre. Par ailleurs, la technologie de fabrication proposée n'est pas collective et l'électrode de nébulisation est réalisée sur la partie extérieure de la pointe d'ESI.

V. Gobry et al. ("Microfabricated polymer
10 injector for direct mass spectrometry coupling", Proteomics 2002, 2, 405-412), J. Kameoka et al. ("An electrospray ionization source for integration with microfluidic", Anal. Chem. 2002, 74, 5897-5901) et J. Wen et al. (Electrophoresis 2000, 21, 191-197)
15 proposent aussi la réalisation de nez électrospray en matériaux polymères à géométrie bidimensionnelle adaptée à la formation d'un cône de Taylor stable et limitant les volumes morts. Mais la technologie utilisée ne propose pas l'intégration d'une électrode
20 de nébulisation. Les tests sont réalisés à l'aide d'un fil d'or plongeant dans un réservoir d'entrée du dispositif.

Une autre approche consiste en l'adaptation de la sortie du canal de séparation pour permettre
25 d'accueillir un PicoTip du commerce (Y. Tachibana et al., "Robust and simple interface for microchip electrophoresis-mass spectrometry", J. of Chromatography, 1011 (2003), 181-192). Cela passe par l'utilisation d'une pièce métallique et/ou plastique
30 jouant un rôle de liaison dans l'assemblage des deux

entités. Ce genre d'assemblage présente des volumes morts importants et ne résout pas le problème de l'utilisation des PicoTips du commerce présentant une certaine irreproductibilité en dimensions et une grande fragilité à l'utilisation.

Deux documents d'une équipe du « California Institute Of Technology » peuvent aussi être cités : Tai et al., "MEMS electrospray nozzle for mass spectroscopy", WO-A-98/35376 et Tai et al., "Polymer-based electrospray nozzle for mass spectrometry", WO-A-00/30167. Les technologies revendiquées pour réaliser un nez électrospray muni d'un filtre amont sont des technologies de surface permettant de réaliser des structures creuses dans du nitrure de silicium dans le premier cas et dans du parylène dans le second. Ces technologies de surface reposent sur l'utilisation d'une couche sacrificielle (en verre au phosphosilicate PSG), qui comme son nom l'indique, n'est pas conservée jusqu'à la fin de l'enchaînement technologique. Le retrait de cette couche, réalisée par gravure chimique, détermine les structures creuses. D'un point de vue géométrique, ces technologies sont intéressantes (formes en pointes du nez), mais elles ne proposent pas l'intégration d'électrodes de nébulisation et les auteurs utilisent la voie classique du fil de platine plongeant dans un réservoir d'entrée pour tester leur système, ce qui est rédhibitoire pour l'obtention d'un système fluide complet (pré-traitement et nez électrospray) à faibles volumes morts.

Enfin, J.E. Moon et al. dans le brevet américain No. 6 464 866 revendiquent un système

d'analyse chimique fabriqué par microtechnologie à partir de deux substrats, de préférence en silicium, et comprenant un système de chromatographie liquide et un dispositif d'électrospray. Le dispositif divulgué dans
5 ce document comporte une pointe du nez électrospray perpendiculaire au plan des substrats utilisés. Cette disposition n'évite donc pas les volumes morts dus aux changements de direction.

10 EXPOSÉ DE L'INVENTION

La présente invention propose un dispositif micro-fluidique permettant divers traitements d'échantillons et disposant d'une bonne interface avec un spectromètre de masse de type ESI, ce qui
15 nécessite :

- Une technologie de réalisation compatible avec celle d'un réseau fluide de pré-traitement (réservoirs, micro-canaux, réacteurs...) et d'une interface ESI en sortie (géométrie en pointes,
20 dimensions de sortie minimales...), et ce, pour permettre de réaliser le dispositif complet sur un même support ou un même ensemble de supports voyant un enchaînement technologique commun aux deux entités intégrées.

- Une conception d'intégration sans volumes
25 morts.

- L'intégration d'une électrode de nébulisation à l'intérieur du canal de sortie et en proximité de la sortie du dispositif.

L'invention a donc pour objet un
30 laboratoire sur puce comprenant un support, au moins un

réseau fluide, au moins un orifice d'entrée de fluide relié au réseau fluide et au moins un orifice de sortie de fluide relié au réseau fluide, une couche mince solidaire du support et dans laquelle sont
5 réalisés le réseau fluide et un nez d'électronébulisation, le nez d'électronébulisation étant en surplomb par rapport au support et comprenant un canal dont une extrémité est reliée au réseau fluide et dont l'autre extrémité constitue ledit
10 orifice de sortie de fluide, le canal étant équipé de moyens de conduction électrique formant au moins une électrode, caractérisé en ce que la couche mince est une couche fixée par scellement direct sur le support.

La face arrière du support, c'est-à-dire
15 celle qui ne supporte pas la couche mince, peut avantageusement être de nature inerte. Elle ne participe alors pas au fonctionnement du dispositif. En particulier, elle ne présente alors pas de connexion électrique.

20 Si le support est en matériau semi-conducteur, les moyens de conduction électrique peuvent être une partie dopée dudit support. Le support peut être en matériau conducteur.

Ce laboratoire peut comprendre un capot
25 recouvrant hermétiquement le réseau fluide, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès fluide à l'orifice d'entrée de fluide.

Selon une autre disposition, le laboratoire sur puce peut comprendre un capot recouvrant
30 hermétiquement le réseau fluide, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès fluide à l'orifice

d'entrée de fluide et étant pourvu desdits moyens de conduction électrique.

Le capot peut être en matériau conducteur. Il peut être en matériau semiconducteur, les moyens de conduction électrique pouvant alors comprendre une
5 partie dopée du capot.

L'utilisation d'un capot permet de rendre le réseau fluide étanche.

Les moyens de conduction électrique peuvent
10 donc se situer tant dans le support que dans le capot et peuvent être réalisés soit par le support ou le capot en matériau conducteur, soit par des piste métalliques déposées sur le support ou le capot isolant, soit être des parties dopées du support ou du
15 capot en matériau semiconducteur.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture
20 de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- la figure 1 est un schéma d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,
- 25 - la figure 2 représente la structure COMOSS d'un réacteur de digestion enzymatique utilisé dans le laboratoire sur puce de la figure 1,
- la figure 2A montre un détail de la figure 2,

- la figure 3 représente la structure COMOSS d'un réacteur de pré-concentration utilisé dans le laboratoire sur puce de la figure 1,
- la figure 3A montre un détail de la
5 figure 3,
- la figure 4 représente la structure COMOSS d'un réacteur de chromatographie utilisé dans le laboratoire sur puce de la figure 1,
- la figure 4A montre un détail de la
10 figure 4,
- la figure 5 est une vue agrandie d'un détail de la figure 1 montrant l'interface ESI,
- les figures 6A à 6D illustrent un premier mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la
15 présente invention,
- les figures 7A et 7B, illustrent un deuxième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,
- les figures 8A à 8D illustrent un
20 troisième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,
- les figures 9A à 9H illustrent un quatrième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,
- les figures 10A et 10E illustrent un
25 cinquième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce selon la présente invention,
- les figures 11A à 11F illustrent un sixième mode de réalisation d'un laboratoire sur puce
30 selon la présente invention,

- la figure 12 illustre une vue de dessus d'un substrat comprenant une pluralité de dispositifs selon la présente invention.

5 EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

La figure 1 est un schéma d'un laboratoire sur puce 1 selon la présente invention. Ce dispositif peut avoir 18 mm de longueur sur 5 mm de largeur.

Le réseau fluidique

10 On décrit d'abord le réseau fluidique destiné à préparer un échantillon biologique complexe afin d'en identifier le contenu protéique. Ce réseau fluidique est constitué d'un ensemble de réservoirs et de canaux, d'un réacteur de digestion enzymatique, d'un
15 réacteur de pré-concentration et d'un réacteur de séparation par électro-chromatographie liquide. La structure de base de tous ces réacteurs est une cavité profonde munie d'un grand nombre de plots de section carrée ou hexagonale...Ce genre de structure est connue
20 sous le nom de COMOSS (pour "Collocated MONolith Support Structures"). On peut se référer à ce sujet à l'article de Bing He et al. intitulé "Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography", Anal. Chem. 1998, 70, 3790-3797. Pour tous les réacteurs, on tire
25 avantage des grands rapports surface/volume développés par ces structures COMOSS, rapports qui augmentent les probabilités de « rencontre » entre les molécules des phases mobiles (protéines par exemple pour le réacteur de digestion enzymatique) et celles des phases

stationnaires (trypsine par exemple pour le réacteur de digestion enzymatique).

Après pré-remplissage complet du réseau
fluidique par du tampon, l'échantillon biologique
5 (protéine) est déposé dans le réservoir R1, puis pompé
en électroosmose du réservoir R1 vers le réservoir R2 à
travers le réacteur de digestion enzymatique 2. Des
réservoirs de grands volumes sont disposés entre les
différents réacteurs du réseau fluidique afin de
10 permettre un changement de tampon entre deux étapes
consécutives du protocole. Ainsi, R1 contient du
bicarbonate d'ammonium ($[\text{NH}_4\text{HCO}_3]=25 \text{ mM}$; $\text{pH} = 7,8$), R2,
R3 et R4 contiennent un mélange eau/acétonitrile
ACN/acide formique TFA (95% ; 5% ; 0,1%), tandis que R5
15 contient un mélange eau/acétonitrile/acide formique
(20% ; 80% ; 0,1%). Le digest récupéré dans le
réservoir R2 doit être concentré avant séparation. Pour
cela, il est pompé en électro-osmose vers le réservoir
R3 (poubelle). L'ensemble des peptides résultant de la
20 digestion enzymatique est alors « capté » par le
réacteur de pré-concentration 3 de faible volume, d'où
la concentration. Un gradient d'acétonitrile, réalisé
par mélange du tampon de R4 et de celui de R5 dans la
structure 4 de type « serpentin » (2cm de longueur),
25 vient ensuite décrocher sélectivement les peptides
selon leur affinité avec la phase stationnaire (C18 par
exemple) du réacteur de pré-concentration 3. Ceux-ci
sont « captés » de nouveau par la colonne de
chromatographie 5, plus dense que le réacteur de pré-
30 concentration 3. L'enrichissement du mélange en ACN
permet de nouveau de décrocher sélectivement ces

peptides de la colonne de chromatographie 5, et de les emmener, séparés, vers la sortie 6 de la puce 1 où le liquide est nébulisé vers l'entrée d'un spectromètre de masse non représenté.

5 Un réacteur d'affinité à une protéine donnée (non représenté) peut servir à capter celle-ci dans un mélange mutli-protéique véhiculé à travers ce réacteur. Pour cela, on peut intégrer en amont du réseau
10 réseau fluide décrit ci-dessus un ensemble réservoirs/réacteur d'affinité/réacteur de concentration fonctionnant selon les mêmes principes fluidiques que précédemment décrit. Le réacteur d'affinité peut être fonctionnalisés d'anticorps et le
15 tampon d'élution peut être constitué de protéines concurrentes (vis-à-vis de l'anticorps) à celle qu'on souhaite « capter » dans le complexe multi-protéique.

✓ le réacteur d'affinité amont

De structure COMOSS, il est destiné à
20 capter de manière spécifique une protéine, une famille de protéines, ou un complexe multi-protéique dans l'échantillon biologique complexe. Les outils utilisés pour cette étape peuvent être des anticorps, mais aussi
25 par exemple des petites molécules qui ont une spécificité d'interaction avec la (les) protéine(s) recherchée(s).

✓ le réacteur de digestion enzymatique

La structure COMOSS du réacteur de
30 digestion enzymatique, représenté à la figure 2, est réalisée à partir d'un ensemble de plots de section

hexagonale de 10 μm permettant de définir un réseau de canaux d'environ 5 μm . Sa largeur utile a est constante (640 μm), mais sa largeur réelle b fait 892 μm . La longueur c de la partie active du réacteur fait 15 mm.

- 5 Ses autres caractéristiques géométriques, à lire en parallèle avec la figure 2, sont décrites dans le tableau suivant :

Entité	Largeur des canaux (μm)	Murs de séparation (μm)
Canal de liaison	640	0
Etage 1	2*320	1*128
Etage 2	4*160	3*64
Etage 3	8*80	7*32
Etage 4	16*40	15*16
Etage 5	32*20	31*8
Etage 6	64*10	63*4

- 10 Cette structure permet éventuellement d'organiser des « billes » de silice de quelques micromètres (Billes Bangs Laboratories distribuées par Serotec France par exemple) fonctionnalisées (Trypsine par exemple) afin d'apporter au réacteur ses propriétés
- 15 enzymatiques ou de les accroître.

A titre d'exemple, l'enzyme greffée sur les plots peut être de la trypsine. Le protocole utilisé est celui décrit dans le document FR-A-2 818 662.

La figure 2A montre un détail de la zone du réacteur référencée 11 sur la figure 2. On reconnaît les plots 12 de section hexagonale permettant de définir le réseau de canaux 13. La référence 14 désigne des billes de silice éventuellement utilisées.

✓ le réacteur de pré-concentration

La structure COMOSS du réacteur de pré-concentration, représenté à la figure 3, est réalisée à partir d'un ensemble de plots de section carrée de 10 μm permettant de définir un réseau de canaux d'environ 2 μm . Sa largeur utile d est constante (160 μm), mais sa largeur réelle e fait 310 μm . La longueur f de la partie active du réacteur fait 170 μm . Ses autres caractéristiques géométriques, à lire en parallèle avec la figure 3, sont décrites dans le tableau suivant :

Entité	Largeur des canaux (μm)	Murs de séparation (μm)
Canal de liaison	160	0
Etage 1	2*80	1*80
Etage 2	4*40	3*40
Etage 3	8*20	7*20
Etage 4	16*10	15*10

Cette structure permet éventuellement d'organiser des billes de silice fonctionnalisées afin

d'apporter au réacteur ou d'en accroître ses propriétés d'affinité (greffage C18 par exemple).

La figure 3A montre un détail de la zone du réacteur référencée 21 sur la figure 3. On reconnaît les plots 22 de section carrée permettant de définir le réseau de canaux 23.

✓ le réacteur de séparation par électrochromatographie liquide

La structure COMOSS du réacteur de séparation, représenté à la figure 4, est réalisée à partir d'un ensemble de plots de section carrée de 10 μm permettant de définir un réseau de canaux d'environ 2 μm . Sa largeur utile g est constante (160 μm), mais sa largeur h réelle fait 310 μm . La longueur i de la partie active du réacteur fait 12 mm. Ses autres caractéristiques géométriques, à lire en parallèle avec la figure 4, sont décrites dans le tableau suivant :

Entité	Largeur des canaux (μm)	Murs de séparation (μm)
Canal de liaison	160	0
Etage 1	2*80	1*80
Etage 2	4*40	3*40
Etage 3	8*20	7*20
Etage 4	16*10	15*10

Pour un gain de place, le réacteur peut être réalisé en trois parties de 12 mm de longueur chacune comme le montre la figure 1.

Cette structure permet éventuellement
5 d'organiser des billes de silice fonctionnalisées afin d'apporter au réacteur ou d'en accroître ses propriétés d'affinité (greffage C18 par exemple).

La figure 4A montre un détail de la zone du réacteur référencée 31 sur la figure 4. On reconnaît
10 les plots 32 de section carrée permettant de définir le réseau de canaux 33.

Interface ESI

La figure 5 est une vue agrandie de la
15 sortie de la puce, référencée 6 sur la figure 1. Le canal de sortie 40 est planaire et d'axe rectiligne par rapport au réseau fluidique. En d'autres termes, le canal de sortie 40 reste parallèle aux plans des différents substrats utilisés pour la réalisation.
20 Cette configuration évite les volumes morts que pourrait occasionner le parcours partiel ou total de l'épaisseur de l'un ou de plusieurs de ces substrats, après avoir parcouru une portion parallèle aux plans de ces substrats. On évite ainsi tout virage, ce qui comme
25 il a été souligné précédemment est primordial, notamment pour véhiculer des échantillons antérieurement séparés.

La section du canal de sortie 40 peut être adaptée en travaillant préférentiellement sur les cotes
30 transversales (dans le plan du substrat) de celui-ci,

ce qui donne la possibilité de réaliser « des restrictions douces » évitant les volumes morts. Sur la figure 5, ces propos sont illustrés par l'existence d'un « raccord » 41 entre la sortie du canal du réacteur de chromatographie 5 et le canal de sortie 40. Une telle restriction est indispensable pour raccorder des structures fluidiques de « grosses » dimensions (« gros » volumes, « grosse » capacité d'affinité par exemple...) à une structure du type interface ESI pour qui, comme on l'a souligné précédemment, il est souhaitable de minimiser la surface de sortie en atteignant typiquement des dimensions de l'ordre du micromètre à quelques micromètres.

En bout de dispositif, le canal de sortie 40 débouche dans une structure de type pointe 42, structure à section extérieure variable permettant de limiter la surface des interfaces liquide / gaz et liquide / solide présentée par le liquide sortant avec son environnement, grâce à son extrémité de faibles sections intérieures et extérieures, tout en conservant une robustesse lors de son utilisation grâce à son extrémité de large section.

Enfin, l'intérieur du canal de sortie 40 est muni d'une électrode 43 permettant d'imposer un potentiel électrique au liquide se présentant à la sortie du dispositif, ce qui est nécessaire pour nébuliser l'échantillon (stabilité du cône de Taylor) et/ou participer à son pompage électroosmotique.

L'ensemble de ces éléments fournit une interface ESI plane complète, puisque robuste, sans volumes morts de raccordement aux réseaux fluidiques et

permettant la naissance d'une cône de Taylor de bonne stabilité.

On va maintenant décrire différents modes de réalisation du dispositif microfluidique muni d'une structure d'électronébulisation selon l'invention. Seul
5 le mode de réalisation préféré, le cinquième, sera décrit en détail.

Pour plus de clarté, ces descriptions sont faites à l'échelle d'une puce (un dispositif), mais les
10 différentes filières technologiques sont réalisées sur des substrats pouvant comporter plusieurs dispositifs (substrats circulaires de 100 mm par exemple).

Dans ces descriptions, le réseau fluidique est simplifié et réduit à un réservoir d'entrée, un
15 canal d'entrée, un microréacteur et un canal de sortie à section constante débouchant dans la structure de type pointe. L'homme de l'art dessinera le réseau fluidique qu'il souhaite, par exemple celui décrit précédemment.

20

Premier mode de réalisation

Ce mode de réalisation est illustré par les figures 6A à 6D. Il n'utilise qu'un seul substrat SOI. De tels substrats sont commercialisés par la société
25 « Soitec ». Les électrodes, les pistes conductrices et les reprises de contact électrique sont réalisées en une seule étape de dopage localisé du silicium.

La figure 6A montre un substrat SOI 50 constitué d'un support 51 en silicium de 500 μm
30 d'épaisseur, supportant successivement une couche

d'oxyde de silicium 52 de 4 μm d'épaisseur et une couche mince 53 de silicium de 25 μm d'épaisseur. La couche mince 53 est dopée localement pour fournir un premier circuit électriquement conducteur formé des zones 54 et 55 et un deuxième circuit électriquement conducteur formé des zones 56 et 57.

Le dopage de la couche mince de silicium 53 est réalisé à travers un masque de résine photosensible (ou d'oxyde de silicium) sur l'intégralité de l'épaisseur de cette couche.

La figure 6B illustre la réalisation du réseau fluidique dans la couche mince 53. Le réseau fluidique est obtenu par gravure DRIE (pour « Deep Reactive Ion Etching »).

La gravure de la couche mince de silicium 53 est partielle (20 μm) dans la partie destinée à constituer le réseau fluidique afin de conserver une portion de piste de silicium dopé (5 μm) au fond de certaines zones du réseau fluidique (en particulier près de sa sortie pour réaliser l'électrode de nébulisation). Le réseau fluidique réalisé comprend un réservoir d'entrée 61, un canal d'entrée 62, un microréacteur 63 et un canal de sortie 64. Au niveau de la structure de type pointe, le canal de sortie définit ici présente alors deux parois latérales et une paroi horizontale (« le sol »). On remarque qu'une extrémité 58 de la zone dopée 55 est située au fond du réservoir d'entrée 61 et qu'une extrémité 59 de la zone dopée 57 est située au fond d'une partie du canal de sortie 64.

Cette étape constitue une étape clef puisqu'elle rend possible une continuité en profondeur

du réseau fluide et du canal de sortie. Ainsi, une connectique à « zéro volume mort » est rendue possible. Ce sera le cas dans tous les autres modes de réalisation.

5 La figure 6C illustre le dégagement de la pointe. Ceci est obtenu par gravure chimique de la partie de la couche d'oxyde 52 située sur la partie droite de la figure.

10 Après cette gravure, la structure de type pointe 65 est libérée et forme un surplomb au-dessus du support 51. Il faut noter que le canal de sortie 64 comporte toujours le sol 66.

15 On réalise ensuite une étape d'isolation électrique du réseau fluide. Ceci est obtenu par une oxydation thermique de 3 μm d'épaisseur du silicium de la couche mince 53. Le support 51 en silicium ne doit pas être oxydé sinon la structure de type pointe 65 ne serait plus en surplomb.

20 Cette étape d'oxydation thermique est nécessaire pour isoler électriquement le liquide présent dans le réseau fluide de l'extérieur. Cette isolation électrique est nécessaire, par exemple, lorsque le pompage électroosmotique est utilisé ou qu'une séparation par électrophorèse ou qu'une réaction
25 électrochimique siégent dans le réseau fluide.

 L'étape suivante consiste à dégager les contacts électriques. Pour dégager les électrodes (les extrémités 58 et 59) et les reprises de contact (les zones 54 et 56), il est nécessaire de graver localement
30 la couche de SiO_2 thermique (3 μm) réalisée précédemment. Cette étape peut être réalisée par une

technique de gravure par laser proposée par la Société NovaLase de Pessac (Gironde, France).

Pour obtenir le laboratoire sur puce selon l'invention, le support 51 est clivé comme le montre la
5 figure 6D pour dégager la structure de type pointe 65.

Second mode de réalisation : fermeture par un capot de pyrex structuré du dispositif décrit dans le premier mode de réalisation

10 Selon ce mode de réalisation, le dispositif 70 (voir la figure 7A) obtenu par le premier mode de réalisation, avant l'étape de clivage finale est scellé à une plaque de recouvrement 71. La plaque de recouvrement 71 comporte une partie d'extrémité 72 en
15 surplomb pour que la plaque 71 ne recouvre pas la structure de type pointe 65. Elle comporte également un trou traversant 73 destiné à assurer une communication fluide avec le réservoir d'entrée 61 du dispositif 70. La plaque de recouvrement 71 peut être un substrat
20 de pyrex, par exemple celui disponible sous la référence Corning 7740.

Une fois le scellement obtenu, on procède à trois clivages. Un premier clivage de la plaque 71 et un clivage du support 51 du dispositif 70 permet de
25 libérer le nez d'électronébulisation. Un deuxième clivage de la plaque 71 permet de libérer les reprises de contact 54 et 56.

30 Troisième mode de réalisation (variante du premier mode de réalisation)

Ce mode de réalisation est illustré par les figures 8A à 8D. Il n'utilise qu'un seul substrat SOI. Les électrodes, les pistes conductrices et les reprises de contact électrique sont réalisées en une seule étape
5 de "lift-off" de métal (aluminium, platine, or, etc.).

La figure 8A montre un substrat SOI 80 constitué d'un support 81 en silicium de 500 μm d'épaisseur, supportant successivement une couche d'oxyde de silicium 82 de 1 μm d'épaisseur et une
10 couche mince 83 de silicium de 25 μm d'épaisseur.

La figure 8B illustre la réalisation du réseau fluidique dans la couche mince 83. Le réseau fluidique est obtenu par gravure DRIE.

La gravure de la couche supérieure de silicium 83 est :
15

- soit partielle afin de conserver un « sol » de silicium au canal de sortie et notamment à la portion du canal de sortie débouchant dans la structure de type pointe (comme représenté pour le
20 premier et le second mode de réalisation),

- soit totale afin de réaliser un canal de sortie de type « fente » au niveau de la structure de type pointe (comme représenté sur la figure 8B).

Par ailleurs, dans ce dernier cas, la gravure peut être éventuellement poursuivie à travers
25 la couche d'oxyde 82, puis dans le support en silicium 81, afin de réaliser un réseau fluidique de grande profondeur.

Le réseau fluidique réalisé comprend un réservoir d'entrée 91, un canal d'entrée 92, un
30 microréacteur 93 et un canal de sortie 94. La gravure

de la couche mince 83 définit également la structure de type pointe 95.

La structure de type pointe 95 est ensuite dégagée par gravure chimique totale de la partie de la
5 couche d'oxyde 82 qui a été révélée par la gravure de la couche 83 et aussi de celle qui se trouve sous la structure de type pointe 95 (voir la figure 8C).

On réalise ensuite une étape d'isolation électrique du réseau fluidique. Ceci est obtenu par une
10 oxydation thermique de 3 μm d'épaisseur du silicium de la couche mince 83.

On réalise ensuite, par "lift-off" de métal, les reprises de contact 84 et 86, les électrodes 88 (au fond du réservoir d'entrée) et 89 (dans le canal
15 du nez d'électronébulisation) ainsi que les pistes conductrices 85 et 87 reliant chaque électrode à sa reprise de contact correspondante (voir la figure 8D). Le support 81 peut alors être clivé pour dégager la structure en pointe 95.

20

Quatrième mode de réalisation (variante du second mode de réalisation) :

Il s'agit d'une variante du second mode de réalisation dans lequel l'utilisation d'un substrat SOI
25 est remplacée par l'utilisation de deux substrats de silicium.

La figure 9A montre un substrat de silicium 100 présentant une face 102 sur laquelle sont réalisés, par dopage localisé, deux circuits électriquement
30 conducteurs. Le premier circuit conducteur est formé

des zones 104 et 105 et le deuxième circuit conducteur est formé des zones 106 et 107.

Le substrat 100 subit ensuite, à partir de la face 102, une gravure RIE (pour "Reactive Ion Etching") ou une gravure chimique au moyen de KOH pour obtenir un évidement 101 en prévision de la structure de type pointe et du clivage du substrat (voir la figure 9B).

Un autre substrat 110 en silicium est ensuite fixé par scellement direct sur la face 102 du substrat 100 (voir la figure 9C).

Le substrat 110 est ensuite aminci jusqu'à obtenir une couche mince 111 (voir la figure 9D).

Le réseau fluidique est ensuite réalisé comme cela est montré à la figure 9E. Au cours de cette étape, la couche mince 111 subit partiellement ou totalement une gravure DRIE. Le réseau fluidique comprend un réservoir d'entrée 121, un canal d'entrée 122, un microréacteur 123 et un canal de sortie 124. La gravure de la couche mince 111 définit également la structure de type pointe 125.

Comme pour les modes de réalisation précédents, on réalise ensuite une étape d'isolation électrique du réseau fluidique. Ceci est obtenu par une oxydation thermique.

L'étape suivante a pour objet de dégager les reprises de contact 104 et 106 (voir la figure 9F). Pour cela il est nécessaire de graver localement la couche mince 111 et l'oxyde thermique. Cette étape peut être réalisée par une technique de gravure par laser. Elle permet de dégager également les électrodes 128 et

129 respectivement situées au fond du réservoir
d'entrée 121 et au fond du canal de sortie 124.

L'étape 9G représente le scellement direct
d'une plaque de recouvrement 131 sur la couche mince
5 111. La plaque de recouvrement 131 comporte une partie
d'extrémité 132 en surplomb pour que la plaque 131 ne
recouvre pas la structure de type pointe 125. Elle
comporte également un trou traversant 133 destiné à
assurer une communication fluïdique avec le réservoir
10 d'entrée 121. La plaque de recouvrement 131 peut être
un substrat de pyrex.

Une fois le scellement obtenu, on procède
au dégagement de la structure de type pointe 125 et des
reprises de contact 104 et 106. Un premier clivage de
15 la plaque 131 et un clivage du substrat 100 permet de
libérer la nez d'électronébulisation. Un deuxième
clivage de la plaque 131 permet de libérer les reprises
de contact 104 et 106.

20 Cinquième mode de réalisation :

Ce mode de réalisation utilise un substrat
SOI et un substrat de pyrex (« Corning » 7740) comme
capot. Les électrodes, les pistes conductrices et les
reprises de contact électriques sont réalisées par
25 dépôt de métal (aluminium, platine, or...) et photo-
lithographie sur la face inférieure du capot de pyrex,
dans lequel elles sont « incrustées ».

La figure 10A montre un substrat SOI 140
constitué d'un support 141 en silicium de 500 µm
30 d'épaisseur, supportant successivement une couche

d'oxyde de silicium 142 de 1 μm d'épaisseur et une couche mince 143 de silicium de 25 μm d'épaisseur.

La figure 10B montre le dispositif obtenu après une étape de gravure DRIE de la couche mince 143.

5 La gravure permet de réaliser le réseau fluidique. Celui-ci comprend un réservoir d'entrée 151, un canal d'entrée 152, un microréacteur 153 et un canal de sortie 154. La gravure de la couche mince 143 est également réalisée sur deux bords du substrat 140

10 jusqu'à révéler la couche d'oxyde 142. Elle permet de définir la structure de type pointe 155.

Cette étape de gravure est classique en microtechnologie. Elle utilise un masque d'oxyde de silicium de 5000Å d'épaisseur réalisé dans un four à

15 1050°C en atmosphère humide. Une couche de 1,3 μm de résine photosensible « Shipley S 1813 SP15 » est ensuite étalée sur piste « SVG » (promoteur d'adhérence : HMDS vapeur). Les motifs 1X sont insolés, puis développés par du « Shipley MIF 310 » sur piste

20 « SVG ». Le masque d'oxyde peut alors être gravé en RIE (pour "Reactive Ion Etching") sous un mélange CHF_3/O_2 , par une « Nextral 330 » par exemple. La résine est ensuite éliminée (par le procédé appelé "stripping") par du Posistrip ou du HNO_3 fumant. Le silicium est

25 alors gravé en DRIE sous un mélange SF_6/O_2 à 110°C par une « Alacatel ICP 601^E » par exemple. Enfin, le masque d'oxyde est décapé par du HF 10% jusqu'à démouillage.

La structure de type pointe est ensuite dégagée par gravure chimique de la couche d'oxyde 142.

30 Cette gravure chimique peut se faire dans un bain appelé BOE (pour "Buffer Oxide Etchant" : $\text{HF}/\text{NH}_4\text{F}$). On

obtient le dispositif représenté à la figure 10C qui montre la structure de type pointe 155 en surplomb. Cette figure montre aussi que l'oxyde, précédemment révélé sur l'autre bord du substrat 140, a été éliminé
5 au cours de la gravure pour révéler le bord 144 du support 141.

Comme pour les modes de réalisation précédents, une isolation électrique du réseau
10 fluide est obtenue par oxydation thermique. Cette oxydation a lieu dans un four à 1150°C en atmosphère humide.

La figure 10D représente le scellement direct d'une plaque de recouvrement 161 sur la couche mince 143. La plaque de recouvrement 161 comporte une
15 partie d'extrémité 162 en surplomb pour que la plaque 161 ne recouvre pas la structure de type pointe 155. Elle comporte également un trou traversant 163 destiné à assurer une communication fluide avec le réservoir d'entrée 151. La plaque de recouvrement 161 peut être
20 un substrat de pyrex. La figure 10D montre aussi que la plaque 161 comporte, sur la face destinée à venir en contact avec la couche mince 143, une piste métallique 164 disposée de façon que son extrémité interne 165 serve d'électrode pour le canal de sortie 154 et que
25 son extrémité externe 166 serve de reprise de contact électrique.

Cette étape de scellement direct se fait à 400°C. Elle nécessite une bonne préparation des surface, à savoir :

30 - un polissage de la plaque de pyrex par une solution de KOH / HF 1% contenant une suspension de

silice colloïdale, suivi d'un nettoyage classique RCVA SC1 ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 1/4/20 à 70°C),

- un nettoyage du substrat de silicium oxydé par un caro ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 2/1 à 140°C) suivi d'un
- 5 nettoyage classique RCVA SC1 ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 1/4/20 à 70°C).

La structuration du capot de pyrex (gravure et « incrustation » de la piste métallique) se fait selon les étapes technologiques suivantes :

- 10 • Réalisation des gravures pour évidement de découpe et « caisson pour piste métallique » :
 - dépôt Cr/Au/Cr/Au (50 Å / 3000 Å / 50 Å / 3000 Å),
 - étalement de résine photosensible
 - 15 « Shipley S 1813 SP15 » sur piste « SVG », épaisseur 1,3 µm,
 - insolation des motifs 1X et 'évidement découpe',
 - développement sur piste « SVG » avec le
 - 20 développeur « Shipley MIF 319 »,
 - gravure Au KI/I₂,
 - gravure Cr avec la solution appelée "Cr Etch",
 - élimination de la résine par "stripping"
 - 25 en utilisant du « Posistrip » ou du HNO₃ fumant,
 - étalement de résine photosensible « Shipley S 1813 SP15 » sur piste « SVG », épaisseur 1,3 µm,
 - insolation des motifs 1X 'évidement
 - 30 découpe et caisson piste métallique',

- développement sur piste « SVG » au moyen du développeur « Shipley MIF 319 »,
 - gravure Au KI/I₂,
 - gravure Cr avec la solution appelée "Cr Etch",
 - gravure du verre sur 25 µm par du HF 10%,
 - élimination de la résine par "stripping" en utilisant du « Posistrip » ou du HNO₃ fumant.
- 10 • Réalisation de la piste métallique « incrustée » :
- gravure "full sheet" Au KI/I₂,
 - gravure "full sheet" Cr avec la solution "Cr Etch",
 - gravure du verre sur 5000 Å avec une
- 15 solution HF 10%,
- décapage Au KI/I₂,
 - décapage Cr avec la solution "Cr Etch",
 - dépôt Cr/Au 50 Å/3000 Å,
 - polissage jusqu'à l'or et le verre
- 20 coplanaires,
- dépôt SiO₂ par PECVD à 300°C - « STS Multiplex »,
 - densification de l'oxyde en four sous gaz neutre.
- 25
- Ouverture des contacts :
- étalement de résine photosensible « Shipley S 1813 SP15 » sur piste « SVG » épaisseur 1,3 µm,
- 30
- insolation des motifs 1X,

- développement sur piste « SVG » avec le développeur « Shipley MIF 319 »,

- gravure du SiO_2 par le procédé RIE « Nextral 330 » - gaz CHF_3/O_2 ,

5 - élimination de la résine par "stripping" en utilisant du Posistrip ou du HNO_3 fumant.

Une fois le scellement obtenu, on procède au dégagement de la structure de type pointe 155 et de la reprise de contact 166 par clivage du support 141
10 (voir la figure 10E). Un premier clivage permet de libérer le nez d'électronébulisation. Un deuxième clivage permet de libérer la reprise de contact.

Sixième mode de réalisation (variante du cinquième mode
15 de réalisation) :

Il s'agit d'une variante du cinquième mode de réalisation dans laquelle l'utilisation d'un substrat SOI est remplacée par l'utilisation de deux substrats de silicium.

20 La figure 11A montre un premier substrat en silicium 170 présentant un évidement 171 en prévision de la structure de type pointe et du clivage de ce substrat. L'évidement est obtenu par gravure RIE, DRIE ou KOH.

25 La figure 11B montre qu'un deuxième substrat 180 en silicium a été fixé sur la face gravée du substrat 170. Cette fixation a été obtenue par scellement direct.

30 La figure 11C montre que le deuxième substrat a été aminci pour donner une couche mince 181 en silicium.

Le réseau fluidique est ensuite réalisé comme cela est montré à la figure 11D. Au cours de cette étape, la couche mince 181 subit une gravure DRIE. Le réseau fluidique comprend un réservoir d'entrée 191, un canal d'entrée 192, un microréacteur 193 et un canal de sortie 194. La gravure de la couche mince 181 définit également la structure de type pointe 195 et permet de révéler le bord 184 du substrat 170.

Comme pour les modes de réalisation précédents, on réalise ensuite une étape d'isolation électrique du réseau fluidique. Ceci est obtenu par une oxydation thermique.

La figure 11E représente le scellement direct d'une plaque de recouvrement 201 sur la couche mince 181. La plaque de recouvrement 201 comporte une partie d'extrémité 202 en surplomb pour que la plaque 201 ne recouvre pas la structure de type pointe 195. Elle comporte également un trou traversant 203 destiné à assurer une communication fluidique avec le réservoir d'entrée 191. La plaque de recouvrement 201 peut être un substrat en pyrex. La figure 11E montre aussi que la plaque 201 comporte, sur la face destinée à venir en contact avec la couche mince 181, une piste métallique 204 disposée de façon que son extrémité interne 205 serve d'électrode pour le canal de sortie 194 et que son extrémité externe 206 serve de reprise de contact électrique.

Une fois le scellement obtenu (voir la figure 11F), on procède au dégagement de la structure de type pointe 195 et de la reprise de contact 206 par clivage du substrat 170. Un premier clivage permet de

libérer le nez d'électronébulisation. Un deuxième clivage permet de libérer la reprise de contact.

Montage pour le pompage électroosmotique

5 En vue d'imposer de manière externe un pompage électroosmotique dans les différents réacteurs du dispositif micro-fluidique, on peut utiliser une carte à pointes réalisée par la société MESATRONIC S.A. de Voiron (Isère, France). Une telle carte est un
10 circuit électrique pouvant tenir aux hautes tensions (10kV) et muni d'un ensemble de pointes en platine venant tremper simultanément dans les différents réservoirs du dispositif. Différents potentiels électriques peuvent donc être imposées en divers points
15 du dispositif afin d'en gérer les différents flux.

Utilisation de l'invention

La figure 12 montre comment l'ensemble des dispositifs « réseau fluide et nez
20 d'électronébulisation » 211 peuvent être répartis sur un substrat circulaire 210 afin de disposer d'un objet unique à N dispositifs microfluidiques, facilitant ainsi un usage à « haut débit » d'analyses.

Dans cette configuration, les réseaux
25 fluidiques sont dessinés radialement, selon les rayons du substrat circulaire 210. N nez d'électronébulisation sont alors répartis selon la circonférence du substrat, et il suffit de faire tourner manuellement ou automatiquement celui-ci pour réaliser un enchaînement
30 en série d'analyses au spectromètre de masse 212. Pour

cela, le support du substrat pourra être monté sur un axe rotatif. La préparation des échantillons, elle, peut être réalisée au préalable en parallèle sur les N dispositifs.

5

Applications industrielles

Les applications possibles de l'invention sont toutes celles qui utilisent pour méthode de détection la spectrométrie de masse avec pour interface la technique d'ionisation par électrospray (ESI pour "ElectroSpray Ionisation").

On peut citer à titre d'exemple l'analyse d'échantillons dans le secteur biomédical et l'industrie pharmaceutique :

- 15 - analyses génétiques,
- protéomique (identification de protéines...),
- développement de médicaments.

20

REVENDICATIONS

1. Laboratoire sur puce comprenant un support (51, 81, 100, 141, 170), au moins un réseau
5 fluïdique, au moins un orifice d'entrée de fluïde relié
au réseau fluïdique et au moins un orifice de sortie de
fluïde relié au réseau fluïdique, une couche mince (53,
83, 111, 143, 181) solidaire du support et dans
laquelle sont réalisés le réseau fluïdique et un nez
10 d'électronébulisation (65, 95, 125, 155, 195), le nez
d'électronébulisation étant en surplomb par rapport au
support et comprenant un canal (64, 94, 124, 154, 194)
dont une extrémité est reliée au réseau fluïdique et
dont l'autre extrémité constitue ledit orifice de
15 sortie de fluïde, le canal étant équipé de moyens de
conduction électrique (59, 89, 129, 165, 205) formant
au moins une électrode, caractérisé en ce que la couche
mince (111, 181) est une couche fixée par scellement
direct sur le support (100, 170).

20

2. Laboratoire sur puce selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support (100)
étant en matériau semi-conducteur, les moyens de
conduction électrique (129) sont une partie dopée dudit
25 support.

3. Laboratoire sur puce selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support est
en matériau conducteur.

30

4. Laboratoire sur puce selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend un capot (131, 201) recouvrant hermétiquement le réseau fluidique, ce capot étant
5 pourvu d'un moyen d'accès fluidique (133, 203) à l'orifice d'entrée de fluide.

5. Laboratoire sur puce selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un
10 capot (201) recouvrant hermétiquement le réseau fluidique, ce capot étant pourvu d'un moyen d'accès fluidique (203) à l'orifice d'entrée de fluide et étant pourvu desdits moyens de conduction électrique (205).

15 6. Laboratoire sur puce selon la revendication 5, caractérisé en ce que le capot est en matériau conducteur.

20 7. Laboratoire sur puce selon la revendication 5, caractérisé en ce que le capot est en matériau semiconducteur, les moyens de conduction électrique comprenant une partie dopée du capot.

1/16

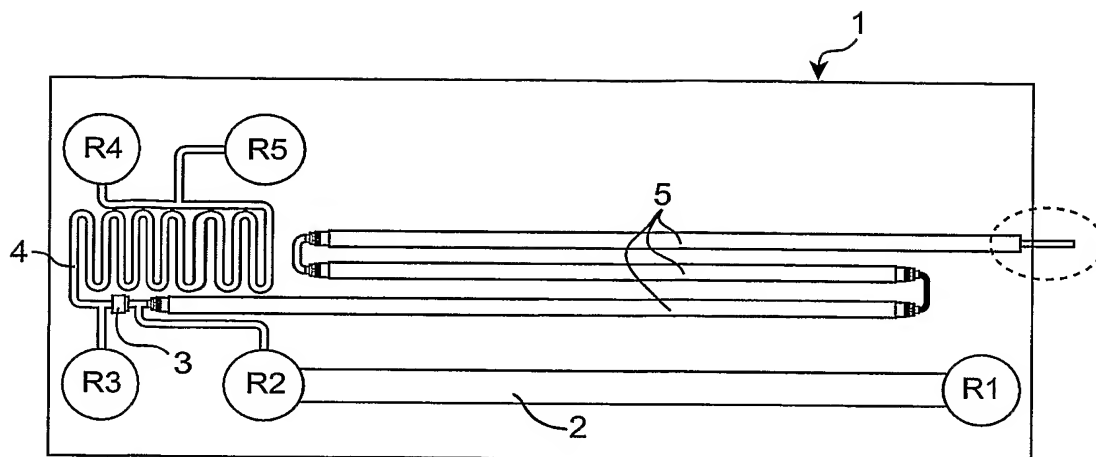


FIG. 1

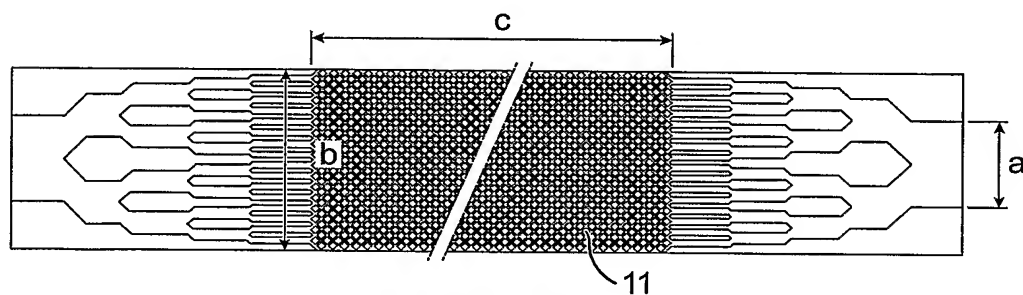


FIG. 2

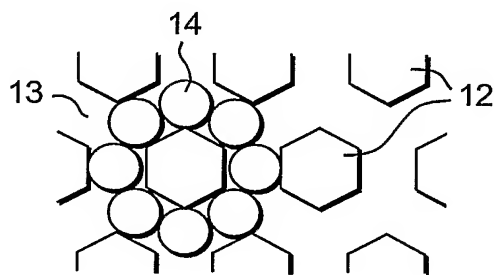


FIG. 2A

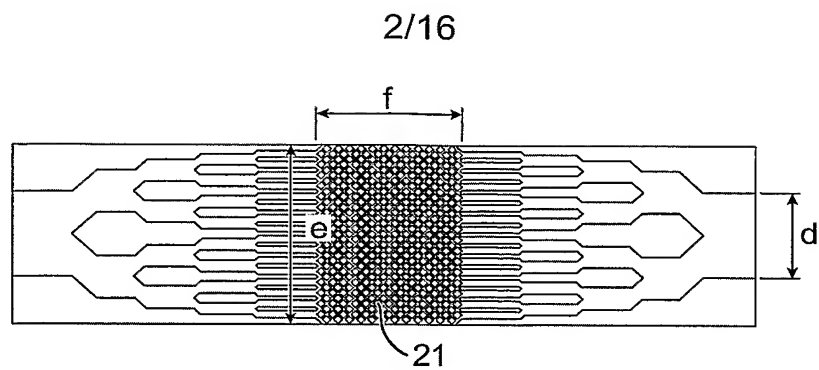


FIG. 3

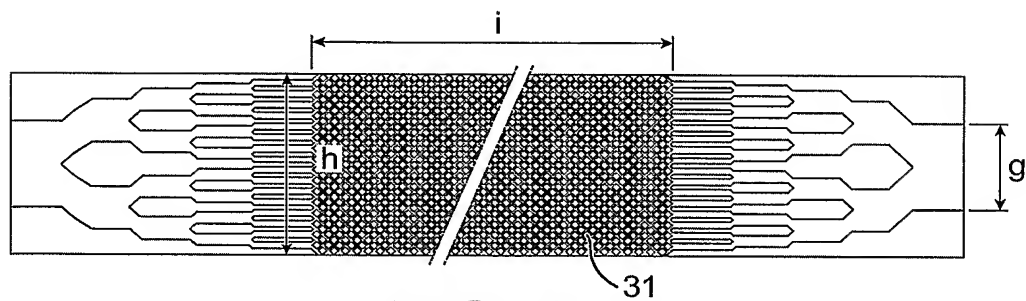


FIG. 4



3/16

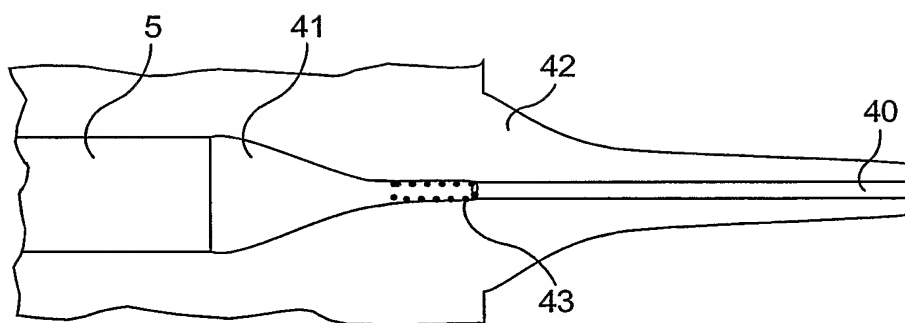


FIG. 5

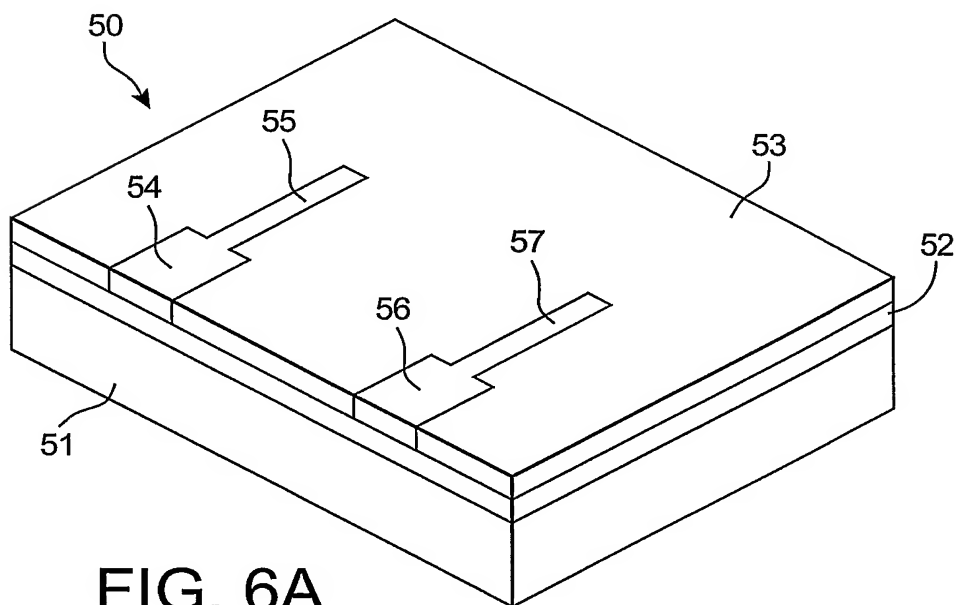


FIG. 6A

4/16

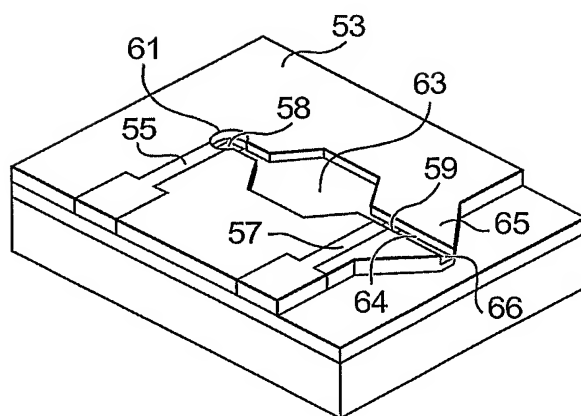


FIG. 6B

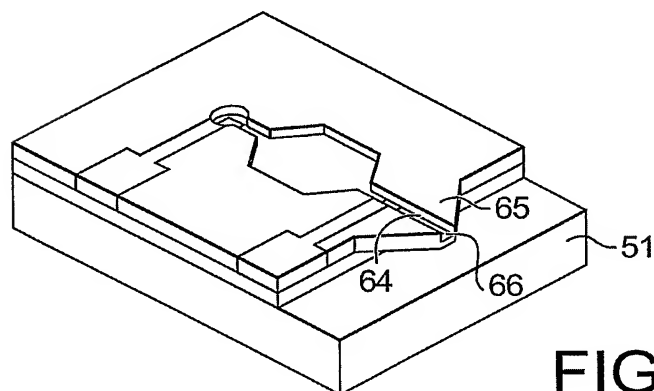


FIG. 6C

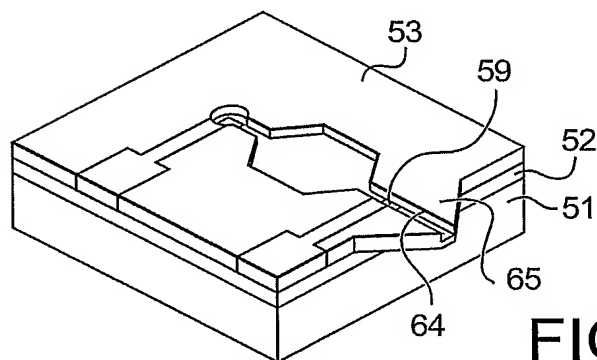


FIG. 6D

5/16

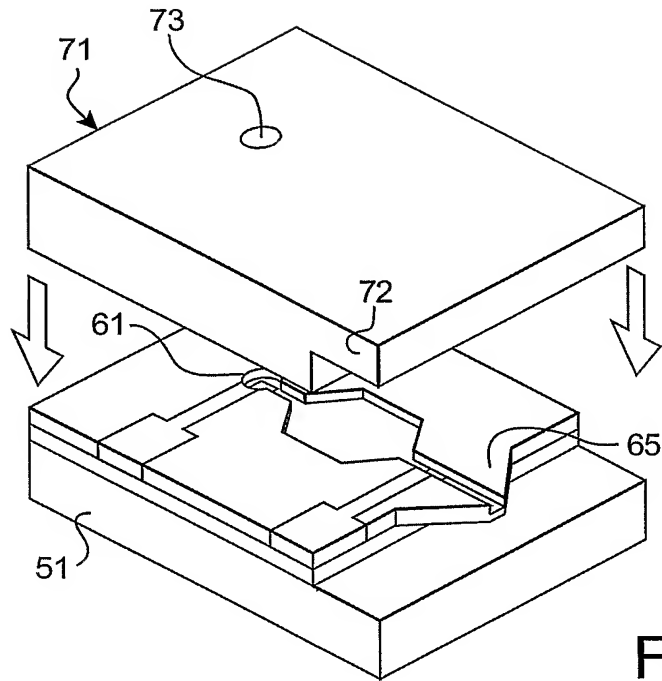


FIG. 7A

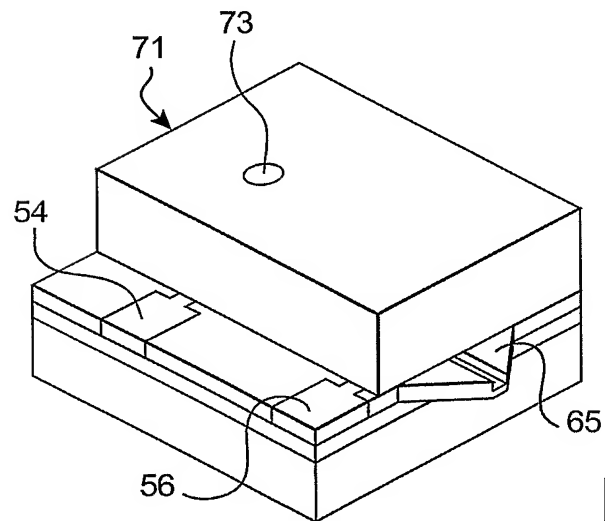


FIG. 7B

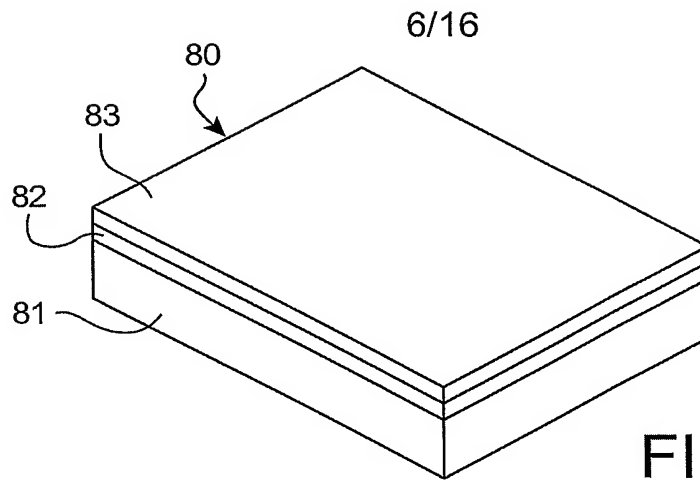


FIG. 8A

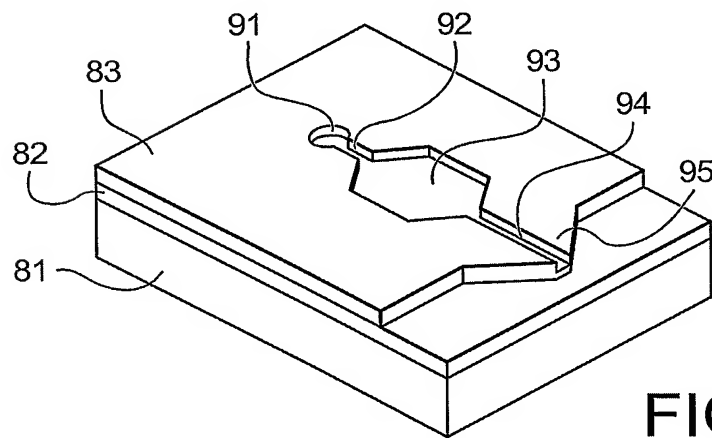


FIG. 8B

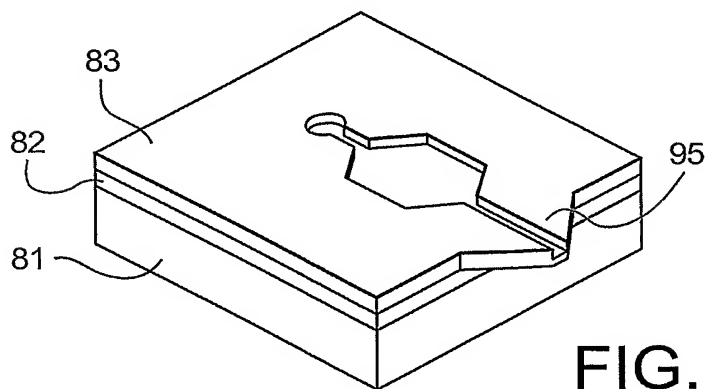


FIG. 8C

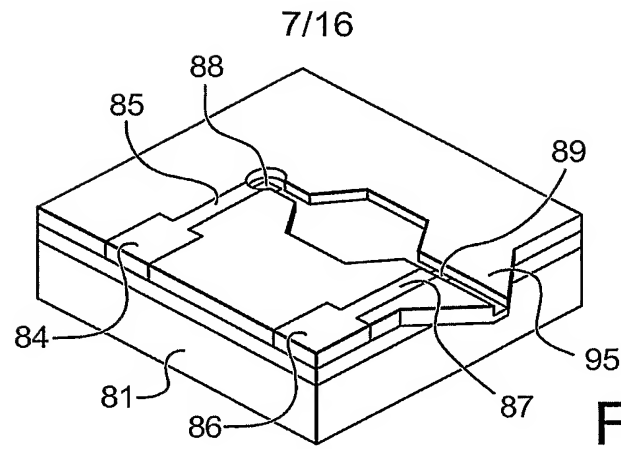


FIG. 8D

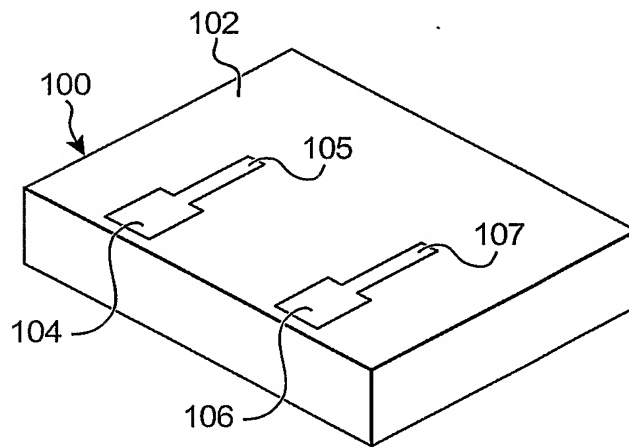


FIG. 9A

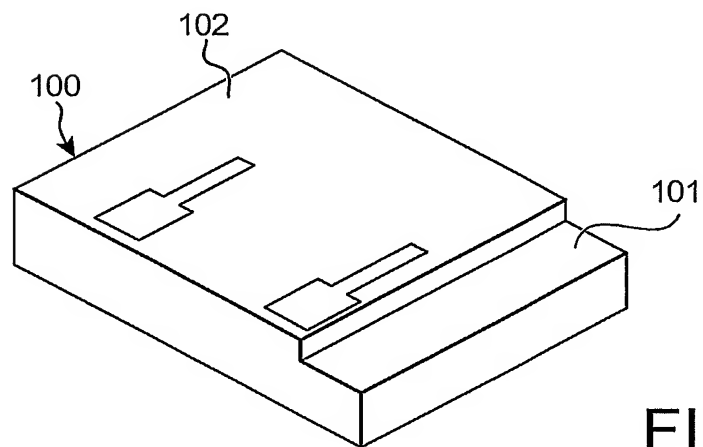


FIG. 9B

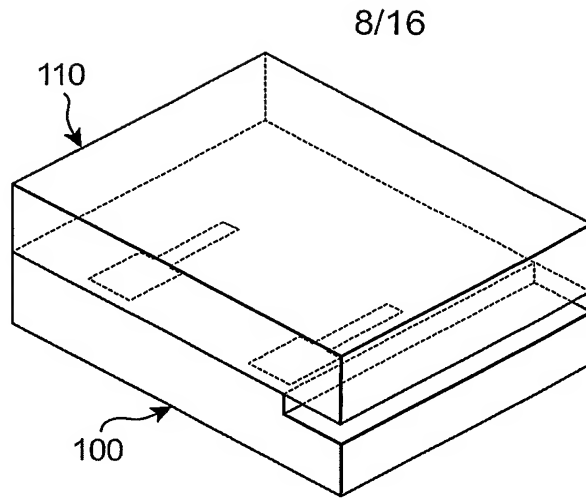


FIG. 9C

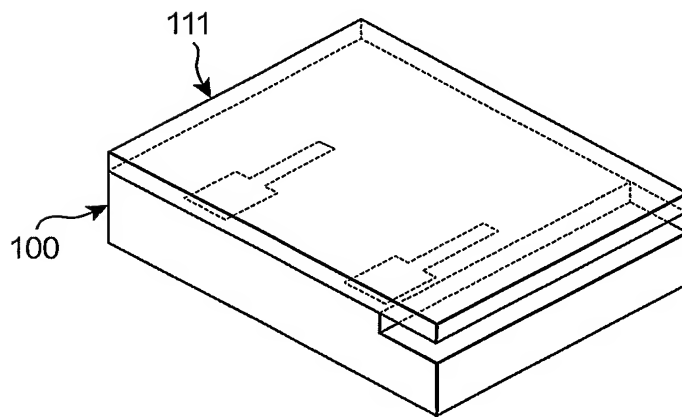


FIG. 9D

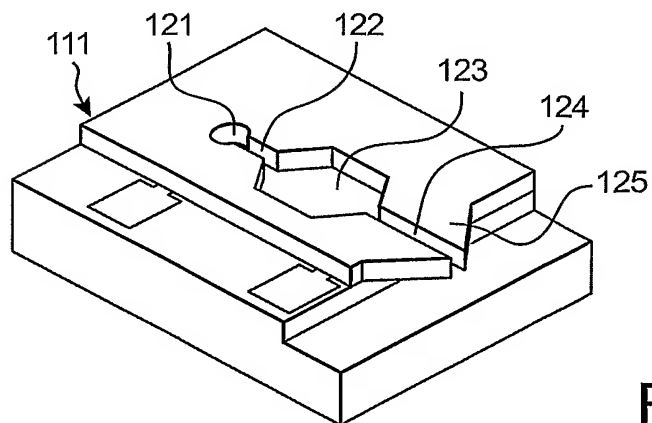


FIG. 9E

9/16

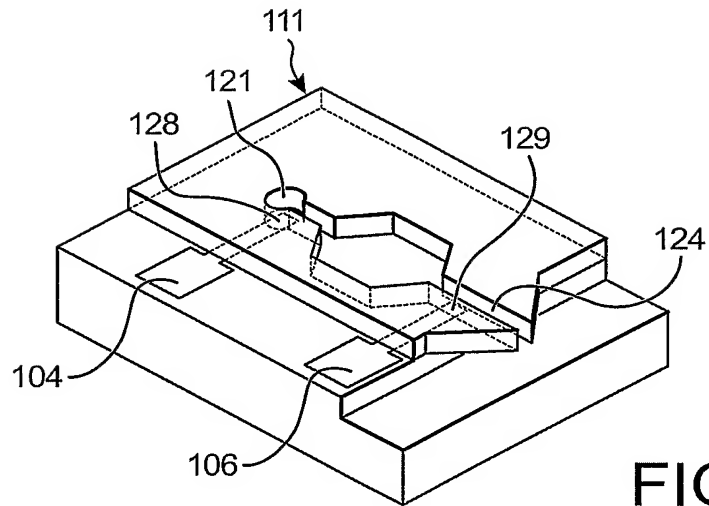


FIG. 9F

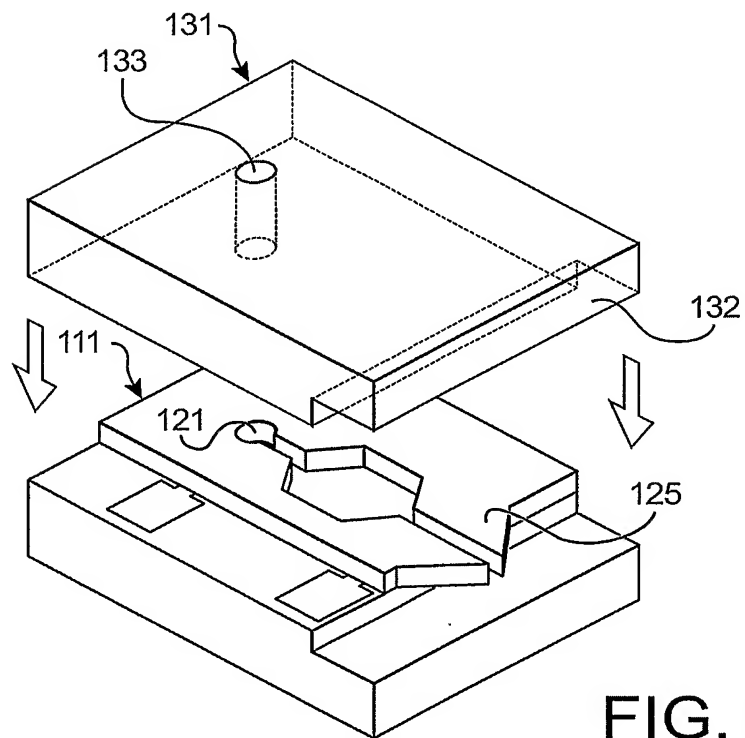


FIG. 9G

10/16

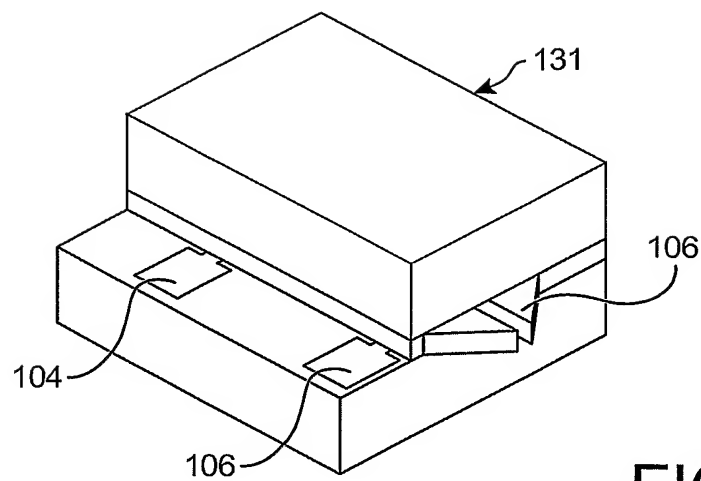


FIG. 9H

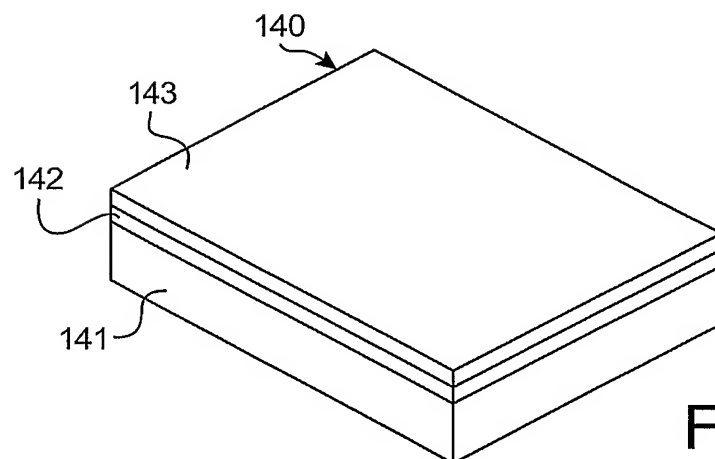


FIG. 10A

11/16

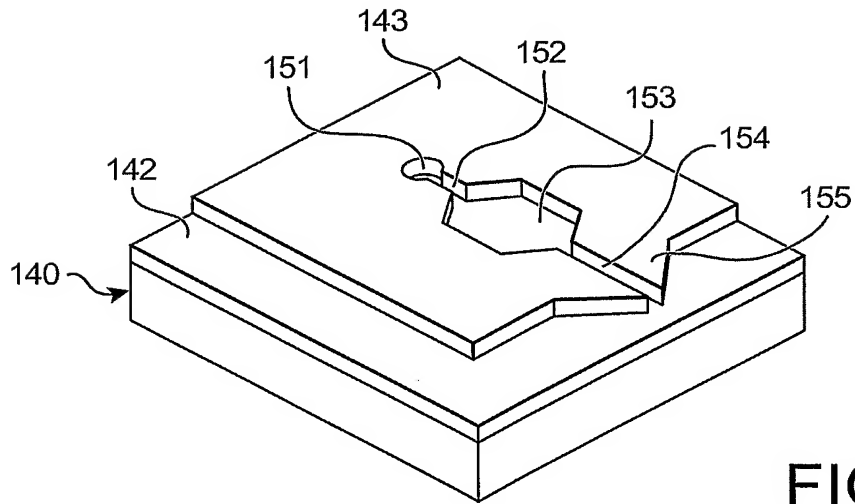


FIG. 10B

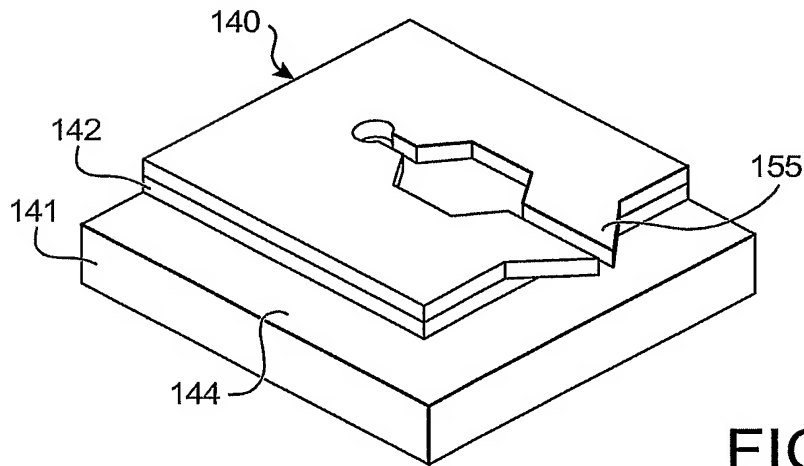
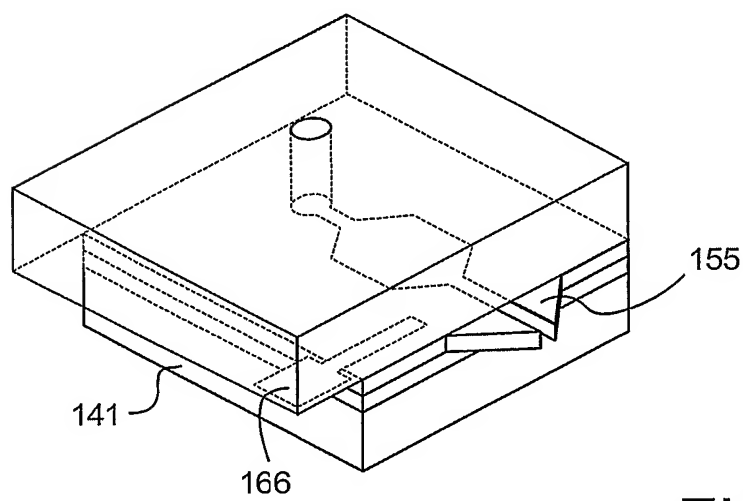
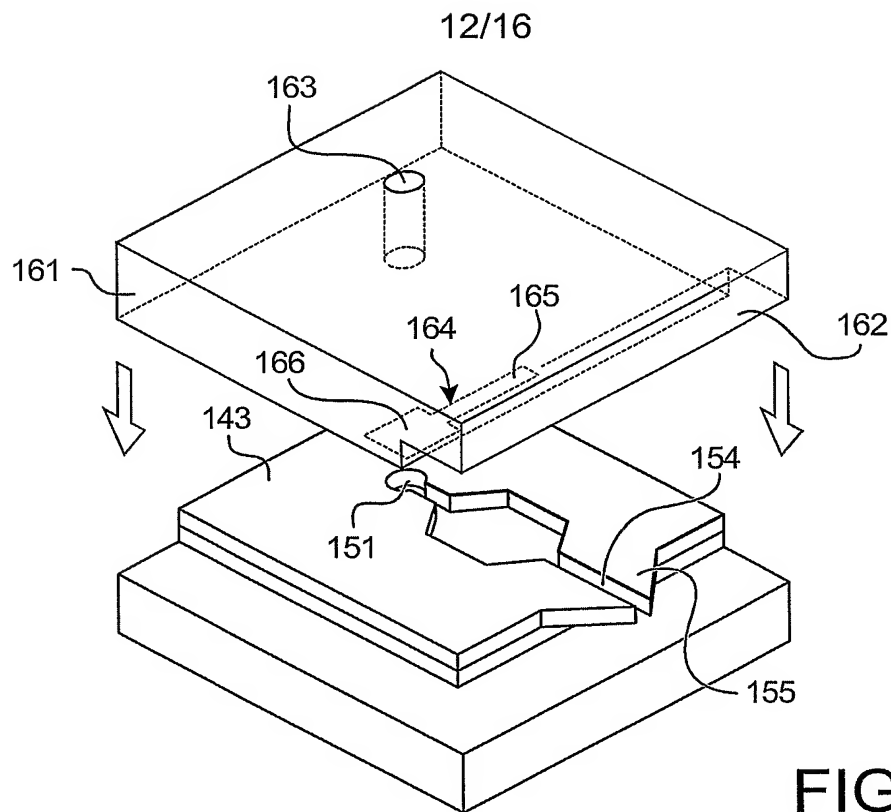


FIG. 10C



13/16

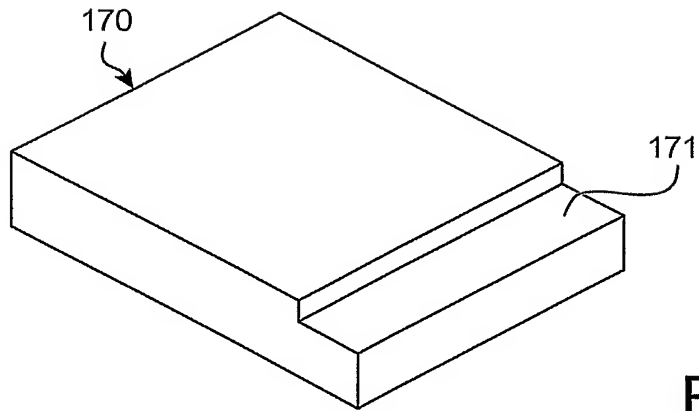


FIG. 11A

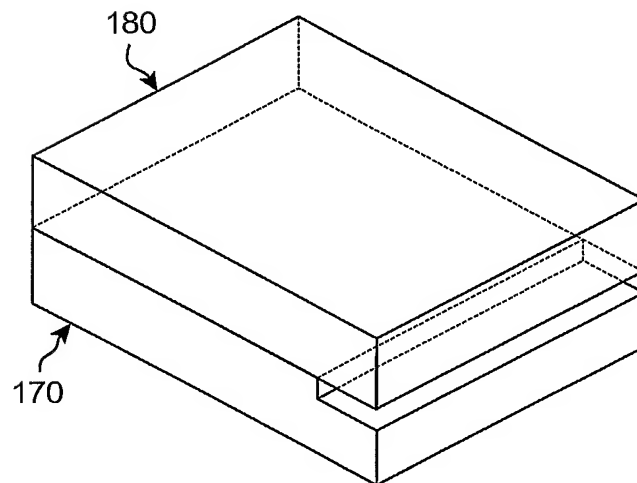


FIG. 11B

14/16

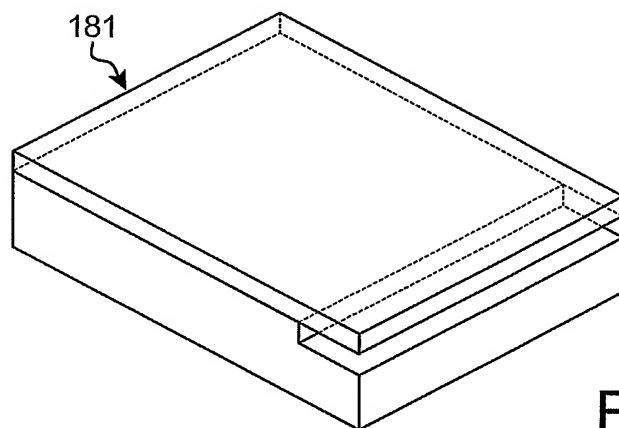


FIG. 11C

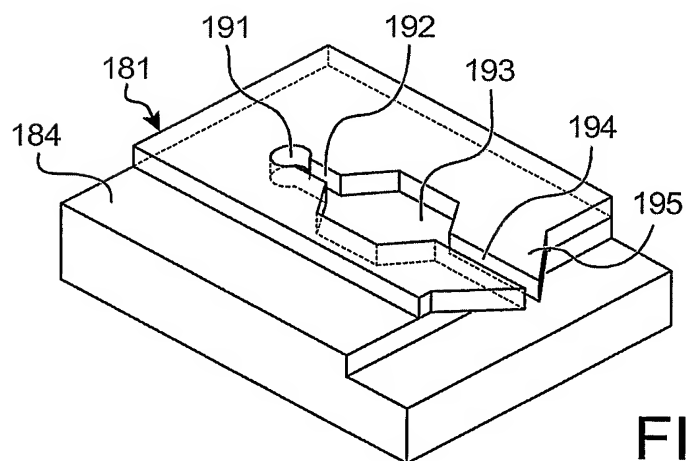


FIG. 11D

15/16

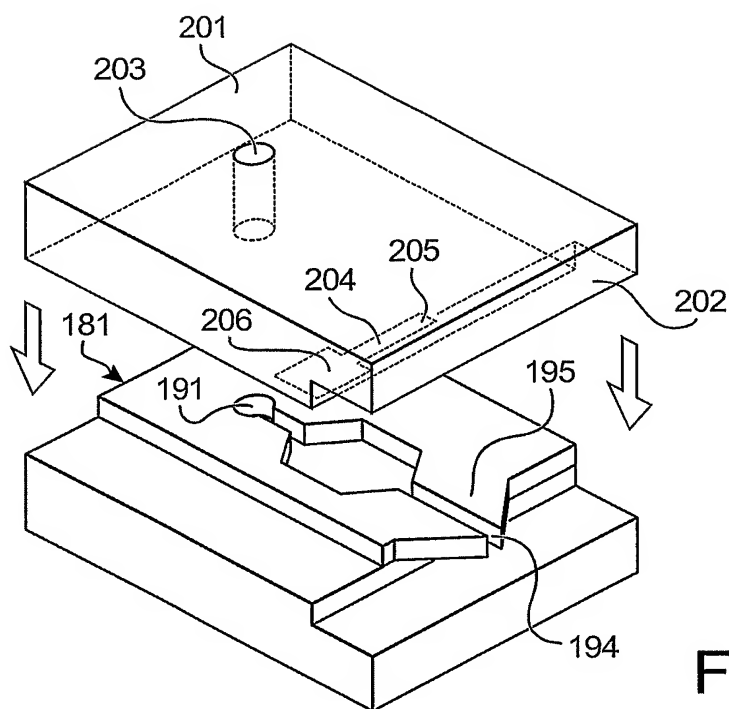


FIG. 11E

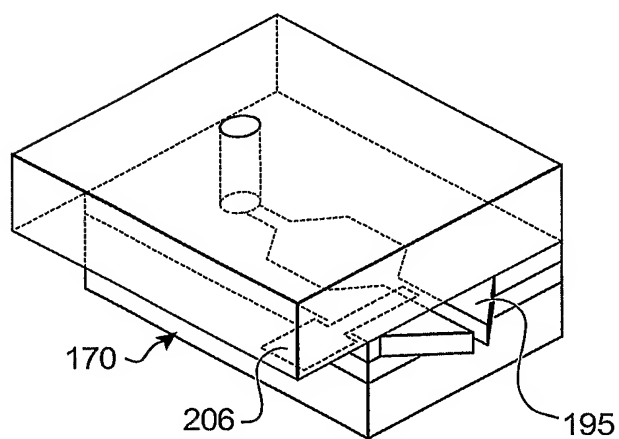


FIG. 11F

16/16

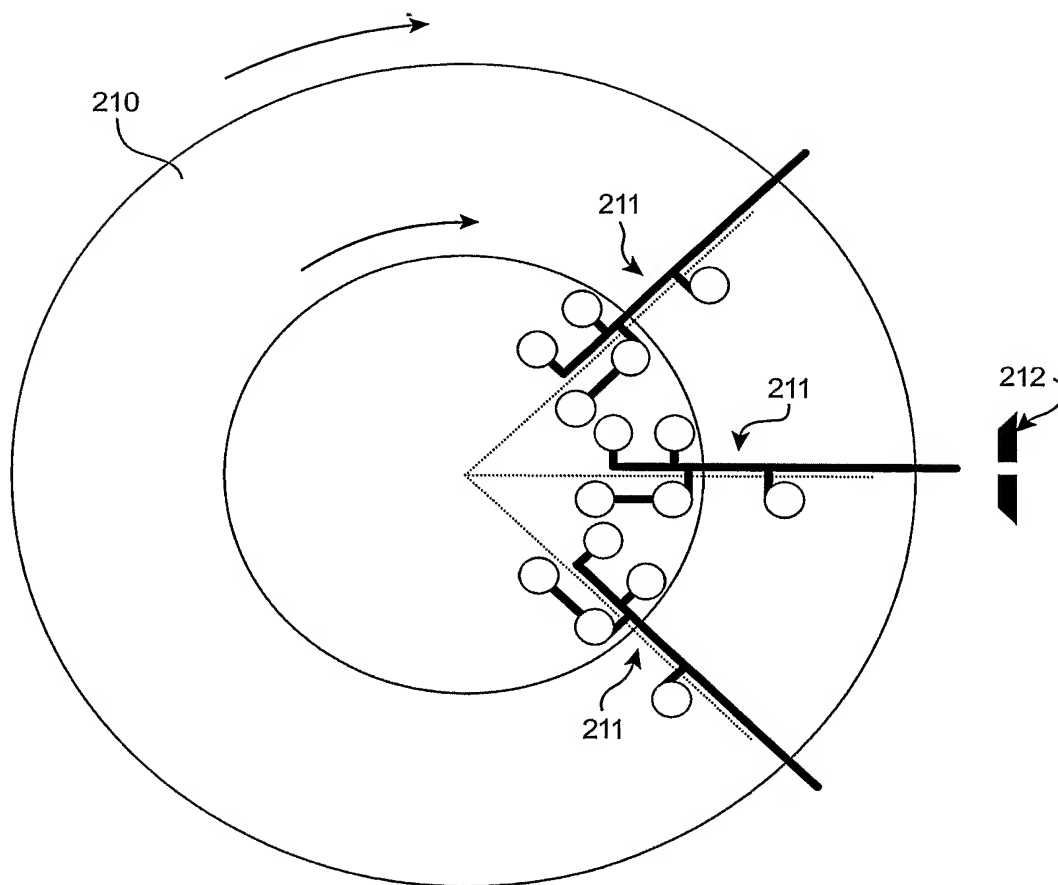


FIG. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/050053

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 H01J49/04 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N H01J B01L B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	US 2003/224531 A1 (BRENNEN REID A ET AL) 4 December 2003 (2003-12-04) abstract paragraphs '0001!, '0038!, '0048! - '0058! figure 4	1
Y	ARSCOTT S ET AL: "Micromachined 2D nanoelectrospray emitter" ELECTRONICS LETTERS, IEE STEVENAGE, GB, vol. 39, no. 24, 27 November 2003 (2003-11-27), pages 1702-1703, XP006024462 ISSN: 0013-5194 the whole document ----- -/--	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2005

Date of mailing of the international search report

29/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bravin, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/050053

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>LIN ET AL: "A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist" J. MICROMECH. MICROENG., vol. 12, 21 June 2002 (2002-06-21), pages 590-597, XP002336579 IOP abstract page 595, column 2, line 11 - page 596, column 2, line 25</p> <p>-----</p>	1
Y	<p>FR 2 839 660 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 21 November 2003 (2003-11-21) abstract page 10, line 15 - page 14, line 20 page 18, line 1 - page 19, line 8 page 25, line 6 - page 27, line 12 figures 1-7</p> <p>-----</p>	1,3,4
Y	<p>WO 99/09042 A (CEPHEID) 25 February 1999 (1999-02-25) abstract page 39, line 30 - page 40, line 12</p> <p>-----</p>	2
Y	<p>US 2003/092195 A1 (MOON ET AL) 15 May 2003 (2003-05-15) paragraph '0152! - paragraph '0166! figures 25A-25B</p> <p>-----</p>	5-7
A	<p>ROHNER ET AL: "Polymer Microspray with an Integrated Thick-Film Microelectrode" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 73, no. 22, 15 November 2001 (2001-11-15), pages 5353-5357, XP002336580 abstract page 5353, column 2, paragraph 3 figure 1</p> <p>-----</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/050053

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 2003224531	A1	04-12-2003	DE	10309583 A1	11-12-2003
FR 2839660	A	21-11-2003	FR	2839660 A1	21-11-2003
			AU	2003255578 A1	02-12-2003
			EP	1507584 A1	23-02-2005
			WO	03097229 A1	27-11-2003
WO 9909042	A	25-02-1999	US	6368871 B1	09-04-2002
			AU	745989 B2	11-04-2002
			AU	8906698 A	08-03-1999
			CA	2301309 A1	25-02-1999
			EP	1003759 A2	31-05-2000
			JP	2001515216 T	18-09-2001
			US	2002042125 A1	11-04-2002
			WO	9909042 A2	25-02-1999
			US	2002175079 A1	28-11-2002
			AU	758407 B2	20-03-2003
			AU	1947299 A	19-07-1999
			CA	2312102 A1	08-07-1999
			EP	1179585 A2	13-02-2002
			EP	1042061 A1	11-10-2000
			JP	2001527220 T	25-12-2001
			WO	9933559 A1	08-07-1999
			US	6440725 B1	27-08-2002
US 2003092195	A1	15-05-2003	AU	5800499 A	03-04-2000
			CA	2343055 A1	23-03-2000
			CN	1515902 A	28-07-2004
			CN	1515903 A	28-07-2004
			CN	1515905 A	28-07-2004
			CN	1124167 C	15-10-2003
			EP	1113850 A1	11-07-2001
			JP	2002524755 T	06-08-2002
			WO	0015321 A1	23-03-2000
			US	2002187073 A1	12-12-2002
			US	2002172618 A1	21-11-2002
			US	2002172619 A1	21-11-2002
			US	2004072337 A1	15-04-2004
			US	6790354 B1	14-09-2004
			US	6780313 B1	24-08-2004
			US	6569324 B1	27-05-2003
			US	6563111 B1	13-05-2003
			US	6579452 B1	17-06-2003
			US	2004155182 A1	12-08-2004
			US	2004182818 A1	23-09-2004
			US	2002123153 A1	05-09-2002
			US	2002158027 A1	31-10-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem...e Internationale No

PCT/FR2005/050053

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 H01J49/04 B01L3/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N H01J B01L B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
X	US 2003/224531 A1 (BRENNEN REID A ET AL) 4 décembre 2003 (2003-12-04) abrégé alinéas '0001!, '0038!, '0048! - '0058! figure 4	1
Y	ARSCOTT S ET AL: "Micromachined 2D nanoelectrospray emitter" ELECTRONICS LETTERS, IEE STEVENAGE, GB, vol. 39, no. 24, 27 novembre 2003 (2003-11-27), pages 1702-1703, XP006024462 ISSN: 0013-5194 le document en entier ----- -/--	1-7

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *S* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 juillet 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/07/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Bravin, M

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>LIN ET AL: "A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist" J. MICROMECH. MICROENG., vol. 12, 21 juin 2002 (2002-06-21), pages 590-597, XP002336579 IOP abrégé page 595, colonne 2, ligne 11 - page 596, colonne 2, ligne 25 -----</p>	1
Y	<p>FR 2 839 660 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 21 novembre 2003 (2003-11-21) abrégé page 10, ligne 15 - page 14, ligne 20 page 18, ligne 1 - page 19, ligne 8 page 25, ligne 6 - page 27, ligne 12 figures 1-7 -----</p>	1,3,4
Y	<p>WO 99/09042 A (CEPHEID) 25 février 1999 (1999-02-25) abrégé page 39, ligne 30 - page 40, ligne 12 -----</p>	2
Y	<p>US 2003/092195 A1 (MOON ET AL) 15 mai 2003 (2003-05-15) alinéa '0152! - alinéa '0166! figures 25A-25B -----</p>	5-7
A	<p>ROHNER ET AL: "Polymer Microspray with an Integrated Thick-Film Microelectrode" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 73, no. 22, 15 novembre 2001 (2001-11-15), pages 5353-5357, XP002336580 abrégé page 5353, colonne 2, alinéa 3 figure 1 -----</p>	1-7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2005/050053

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2003224531 A1	04-12-2003	DE 10309583 A1	11-12-2003
FR 2839660 A	21-11-2003	FR 2839660 A1	21-11-2003
		AU 2003255578 A1	02-12-2003
		EP 1507584 A1	23-02-2005
		WO 03097229 A1	27-11-2003
WO 9909042 A	25-02-1999	US 6368871 B1	09-04-2002
		AU 745989 B2	11-04-2002
		AU 8906698 A	08-03-1999
		CA 2301309 A1	25-02-1999
		EP 1003759 A2	31-05-2000
		JP 2001515216 T	18-09-2001
		US 2002042125 A1	11-04-2002
		WO 9909042 A2	25-02-1999
		US 2002175079 A1	28-11-2002
		AU 758407 B2	20-03-2003
		AU 1947299 A	19-07-1999
		CA 2312102 A1	08-07-1999
		EP 1179585 A2	13-02-2002
		EP 1042061 A1	11-10-2000
		JP 2001527220 T	25-12-2001
		WO 9933559 A1	08-07-1999
		US 6440725 B1	27-08-2002
US 2003092195 A1	15-05-2003	AU 5800499 A	03-04-2000
		CA 2343055 A1	23-03-2000
		CN 1515902 A	28-07-2004
		CN 1515903 A	28-07-2004
		CN 1515905 A	28-07-2004
		CN 1124167 C	15-10-2003
		EP 1113850 A1	11-07-2001
		JP 2002524755 T	06-08-2002
		WO 0015321 A1	23-03-2000
		US 2002187073 A1	12-12-2002
		US 2002172618 A1	21-11-2002
		US 2002172619 A1	21-11-2002
		US 2004072337 A1	15-04-2004
		US 6790354 B1	14-09-2004
		US 6780313 B1	24-08-2004
		US 6569324 B1	27-05-2003
		US 6563111 B1	13-05-2003
		US 6579452 B1	17-06-2003
		US 2004155182 A1	12-08-2004
		US 2004182818 A1	23-09-2004
		US 2002123153 A1	05-09-2002
		US 2002158027 A1	31-10-2002